

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR PALOTINA**  
**CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATO ETANÓLICO DE *Impatiens walleriana*  
Hook. f. E *Catharanthus roseus* (L.) G. Don**

**Área: Microbiologia Aplicada**

**Aluna:** Cheila Gracieli Spohr  
**Supervisora:** Profa. Roberta Paulert  
**Orientadora:** Profa. Dra. Roberta Paulert

Trabalho de conclusão de curso de  
graduação apresentado como requisito  
parcial para a conclusão do Curso  
Superior de Tecnologia em Biotecnologia.

**PALOTINA - PR**  
**Agosto de 2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR PALOTINA  
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATO ETANÓLICO DE *Impatiens walleriana*  
Hook. f. E *Catharanthus roseus* (L.) G. Don**

**Aluna:** Cheila Gracieli Spohr  
**Supervisora:** Profa. Dra. Roberta Paulert  
**Orientadora:** Profa. Dra. Roberta Paulert

Trabalho de conclusão de curso de  
graduação apresentado como requisito  
parcial para a conclusão do Curso  
Superior de Tecnologia em Biotecnologia.

PALOTINA - PR  
Agosto de 2013



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR PALOTINA  
CURSO DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA




## FOLHA DE APROVAÇÃO

Universidade Federal do Paraná  
Setor Palotina  
Curso Superior de Tecnologia em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso  
Área de Estágio: Microbiologia Aplicada  
Acadêmico: Cheila Gracieli Spohr  
Orientador do Estágio: Roberta Paulert

O presente trabalho de conclusão de curso foi apresentado e aprovado pela seguinte banca examinadora:

  
Prof.ª Dr.ª Patrícia da Costa Zonetti

  
Prof. Dr. Vagner Gualarte Cortez

  
Prof.ª Dr.ª Roberta Paulert  
Orientadora

Palotina, PR, 01 de agosto de 2013.

*“Contaram-me e Esqueci. Vi e Entendi. Fiz e Aprendi” (Confúcio).*

A Deus, a minha família e a todos que de alguma maneira contribuíram para a minha formação acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, por minha família, pela natureza, pela sabedoria, pela esperança e por seu infinito amor e perfeição.

A minha mãe, Amélia Paulus, por seu amor, dedicação, puxões de orelha, por seu exemplo, incentivo e principalmente, pela minha existência.

Ao meu irmão, Giovane Claudinei Spohr e minha cunhada Sandra Luchtenberg Spohr, pelo exemplo, apoio e incentivo.

Ao William dos Santos Soares, que me incentivou e apoiou durante esta caminhada com muito amor e carinho.

Aos meus amigos, que alegraram e divertiram meus finais de semana.

Aos meus colegas de faculdade, pelo companheirismo, pelas novas amizades conquistadas e pelas boas lembranças que me proporcionaram.

A todos os professores do Colegiado de Tecnologia em Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, por compartilharem seus conhecimentos comigo, sem vocês, eu não teria chegado até aqui.

Em especial a Professora Doutora Roberta Paulert, pela orientação, atenção e sabedoria compartilhados comigo.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3. OBJETIVO GERAL.....	7
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
6. CONCLUSÃO.....	12
7. REFERÊNCIAS.....	13

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Espécies vegetais utilizadas nos experimentos (a) *Catharanthus roseus* e (b) *Impatiens walleriana*.....8
- Figura 2.** (a) Auxílio de um furador estéril para retirar bloco de ágar formando poços no meio batata dextrose ágar. (b) Após a incubação, o halo de inibição do crescimento microbiano ao redor do poço contendo a substância em análise é determinado em mm com auxílio de uma régua.....9
- Figura 3.** Para cada uma das duas espécies de leveduras testadas (*Candida albicans* e *Candida tropicalis*) foram testados os extratos obtidos de *Catharanthus roseus* e *Impatiens walleriana* autoclavados e não autoclavados: extrato bruto (1), diluído a 10% (2); 5% (3); 1% (4) e como controle foi utilizado água destilada (5).....9
- Figura 4.** Teste de difusão em ágar de extratos alcoólicos obtidos de folhas de *Catharanthus roseus* (a) autoclavado e (b) não autoclavado frente à levedura *Candida albicans* onde (1) corresponde ao extrato bruto; (2) extrato 10%; (3) extrato 5%; (4) extrato 1% e (5) água destilada (testemunha).....10
- Figura 5.** Teste de difusão em ágar de extratos alcoólicos obtidos de folhas de *Catharanthus roseus* (a) extrato autoclavado e (b) extrato não autoclavado frente à levedura *Candida tropicalis* onde (1) corresponde ao extrato bruto; (2) extrato 10%; (3) extrato 5%; (4) extrato 1% e (5) água destilada (testemunha).....10
- Figura 6.** Teste de difusão em ágar de extratos alcoólicos obtidos de folhas de *Impatiens walleriana* (a) autoclavado e (b) não autoclavado frente à levedura *Candida albicans* onde (1) corresponde ao extrato bruto; (2) extrato 10%; (3) extrato 5%; (4) extrato 1% e (5) água destilada (testemunha).....12
- Figura 7.** Teste de difusão em ágar de extratos alcoólicos obtidos de folhas de *Impatiens walleriana* (a) autoclavado e (b) não autoclavado frente à levedura *Candida tropicalis* onde (1) corresponde ao extrato bruto; (2) extrato 10%; (3) extrato 5%; (4) extrato 1% e (5) água destilada (testemunha).....12



**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Efeito dos extratos alcoólicos de <i>Impatiens walleriana</i> (autoclavados ou não) sobre o crescimento de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida tropicalis</i> pelo teste de difusão em ágar após um período de incubação de 24 horas.....	11
---	----

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades vem sendo empregado desde os primórdios da existência humana. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das propriedades terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem todos os seus constituintes químicos conhecidos. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantém a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a biologia vegetal. A grande diversidade da flora brasileira oferece recursos alternativos no tratamento de patologias humanas, despertando o interesse pela pesquisa de novos fármacos. Por apresentar diversos compostos, atualmente as plantas medicinais são matéria-prima para a composição de diversos antimicrobianos (MACIEL et al., 2002).

Com certa frequência, as infecções produzidas por fungos são difíceis de responderem à terapêutica medicamentosa e este fato está associado à complexidade da própria micose, do agente etiológico, a fatores predisponentes envolvidos e aos efeitos indesejáveis dos antifúngicos (LIMA et al., 2006).

Segundo Cook (2001), a candidíase vulvovaginal (CVV) é uma das infecções mais comuns do trato genital feminino. A CVV, juntamente com a candidíase oral, são consideradas as duas formas mais comuns de infecções fúngicas oportunistas, sendo a *Candida albicans* seu agente etiológico mais frequente. Estudos demonstram a atividade biológica de extratos naturais na inibição do crescimento destas leveduras. Stefanello et al. (2006) com *Gochnatia polymorpha*, observaram que o extrato da casca em diclorometano, inibiu significativamente o crescimento de *Candida albicans* e, em pesquisa realizada com óleo de *Rosmarinus officinalis* (alecrim), obteve-se o mesmo efeito (PACKER e LUZ, 2006). Castro e Lima (2010) observaram que as cepas de *Candida* apresentam-se sensíveis ao óleo essencial de *Eucalyptus globulus*. A propriedade anti-leveduriforme do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) também foi observada por Araújo (2004) sobre cepas de *Candida* isoladas de meio ambiente. Por outro lado, Lima et al. (2006) observaram que o óleo essencial de *Eugenia uniflora* apresenta baixo poder de inibição sobre as cepas de *Candida*. A folha de *Psidium guajava* (goiabeira) apresenta atividade antimicótica, através do macerado

hidroalcoólico de suas folhas contra cepas de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. stelatoide* (Alves et al. 2006).

Nas últimas décadas o uso irracional de antimicrobianos determinou o surgimento de cepas de microrganismos multirresistentes, bem como o aparecimento de efeitos indesejáveis de alguns fármacos. Este fator que faz com que a busca por novos agentes antimicrobianos seja uma importante estratégia no estabelecimento de terapias alternativas para infecções de difícil tratamento (MACIEL et al., 2002). Linhas de pesquisa têm sido desenvolvidas com êxito por diversos pesquisadores, baseadas nas propriedades anti-infecciosas e anti-inflamatórias de muitas plantas de utilização consagrada pela medicina popular e poderão contribuir inovadoramente na terapêutica antimicrobiana (YAMAMOTO e OGAWA, 2002).

Alguns fatores têm contribuído para este aumento de interesse e entre eles está a grande eficácia de algumas substâncias de plantas medicinais. Vários estudos descrevem a atividade antifúngica de *Catharanthus*. Segundo Santos et al. (2009), foram detectados compostos metabólicos secundários (alcalóides indol monoterpenóide - vinblastina e vincristina), em várias partes da planta, sendo usados na produção de medicamentos farmacêuticos, com efeito, antitumoral.

A atividade antifúngica de extratos de *Impatiens walleriana* da família *Balsaminaceae* (popularmente conhecida como beijinho) é pouco explorada. Segundo Domingues et al., (2009), a *I. walleriana* apresentou atividade antimicrobiana frente a *S. rolfsii* e *A. solani*. As sementes dessa planta contêm peptídeos com propriedades antifúngicas. De Lucca et al. (1998-1999) revelaram que esses compostos podem ser letais para espécies de *Aspergillus* e *Fusarium*. No entanto, não foram encontrados trabalhos científicos baseados na atividade dos extratos de *I. walleriana* frente a espécies de *Candida*. Assim, são necessários estudos que avaliem a atividade antimicrobiana do beijinho com o intuito de ampliar o seu uso.

Com base nas informações acima, existem poucos trabalhos científicos que descrevem a atividade antifúngica de extratos de *C. roseus* e *I. walleriana* e assim torna-se importante a determinação da atividade biológica dos extratos alcoólicos frente as principais espécies de leveduras causadoras de micose ao homem, para a busca de novos compostos com propriedades biológicas.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **A atividade antimicrobiana de plantas medicinais**

A diversidade bioquímica das plantas é tão rica quanto a dos animais. Dentre os produtos naturais, as plantas medicinais possuem grande interesse científico devido à possibilidade de serem empregadas como fitofármacos, proporcionando grandes chances de obterem-se moléculas protótipos a partir da sua diversidade de constituintes. Plantas que apresentam atividade antimicrobiana são de extrema importância devido ao fato de microrganismos resistentes apresentarem tal mecanismo não somente aos antibióticos já pré-estabelecidos, como também aos de última geração, causando sérios problemas de saúde pública (DOMINGUES et al., 2009).

As primeiras evidências do uso de plantas com fins terapêuticos datam de 460 a.C. No entanto, as primeiras informações sobre o uso sistemático de plantas como medicamentos datam da Índia Antiga. No Brasil, assim como em vários outros países da América Latina, a fitoterapia constitui uma alternativa econômica quando relacionada aos medicamentos alopáticos. De modo que, nos últimos anos, a fitoterapia atingiu um notável crescimento, assim como também, o estudo dos metabólitos secundários ou metabólitos especiais produzidos pelas plantas, os quais desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da química sintética. Sobre este prisma, a busca de novos compostos vegetais com ação antimicrobiana se apresenta como um modelo experimental, ecologicamente correto, para se produzir substâncias que sejam eficazes e menos agressivas ao meio ambiente e aos homens, contribuindo, assim, com a melhoria da qualidade de vida (CATÃO et al., 2005).

O aparecimento de resistência resulta em diversos fatores, tais como: uso crescente e inadequado de antimicrobianos, procedimentos invasivos, grande número de hospedeiros susceptíveis e falhas terapêuticas, entre outros, ocasionando aumento da transmissão de organismos multirresistentes. Atualmente, muitas cepas são resistentes a quase todos os antimicrobianos e a perspectiva de aparecimento de uma cepa resistente a todos os antimicrobianos constitui uma séria preocupação. A necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem estudadas no combate a esses microrganismos representam um desafio no tratamento de infecções (CATÃO et al., 2005).

Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais. Os mais conhecidos incluem o método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição. Para determinar a concentração mínima inibitória

ou a concentração mínima bactericida de extratos ativos de plantas, tem-se utilizado um método sensível desenvolvido por Eloff em 1998 (OSTROSKY et al., 2008).

### **A espécie *Catharanthus roseus***

Da família *Apocynaceae*, é popularmente chamada de vinca ou pervinca, e é provavelmente originária de Madagascar. É uma planta herbácea de crescimento rápido, com 40 a 80 cm de altura. As flores são de cor lilás, rosa ou branca, ocorrendo formas diversas nas variedades cultivadas. Há muito tempo a vinca é reconhecida pelas numerosas propriedades medicinais, pois é rica em alcaloides; alguns de comprovada ação antitumoral, usados nos tratamentos de carcinomas, doença de Hodgkin e leucemia linfocítica, outros de ação hipoglicêmica e muitos deles com atividade contra vírus (DEMATTE et al., 1987). Os alcalóides da vinca são um grupo de metabólitos secundários constituídos por moléculas antineoplásicas composto por vinblastina, vincristina, e o derivado semisintético vinorelbina, amplamente empregados no tratamento de diversos tipos de câncer (SANTOS et al., 2009). É possível sugerir que a vinflunina, também presente na vinca, no futuro, venha a substituir a vinorelbina como antineoplásico por ser mais eficaz e por apresentar um maior espectro de ação (OLIVEIRA et al., 2012).

Segundo Patil e Ghosh (2010), extratos de diferentes partes de *C. roseus* (folhas, hastes, flores e raízes) foram usados e submetidos para ensaio antibacteriano. Os extratos de *C. roseus* não exibiram atividade contra *Staphylococcus aureus*. Além disso, extrato de folhas, hastes e flores foram também ineficaz contra *Pseudomonas aeruginosa*. O extrato de folhas não apresentou atividade contra *Corynebacterium diphtheriae*. Similarmente o extrato bruto da haste não mostrou atividade contra *Shigella boydii*. O mais eficaz foi o extrato da raiz, que exibiu amplo espectro de atividade antibacteriana contra *Salmonella typhimurium* e *S. boydii*. O extrato da flor mostrou contra *C. diphtheriae*.

Khalil (2012), investigou a atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de *C. roseus* da Arábia Saudita contra alguns microrganismos patogênicos humanos (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) bem como em fungos patogênicos (*Candida albicans*). Os extratos testados apresentaram forte atividade antimicrobiana contra todos os organismos. A atividade antimicrobiana foi avaliada através da medida da zona de inibição usando o disco método de difusão. A atividade de inibição do extrato da folha foi observada contra *Staphylococcus aureus* (zona de 15 mm), seguido por *E. coli*. O extrato alcoólico de folhas também demonstrou atividade antifúngica contra os fungos patogênicos *Candida albicans* (12 mm de zona de inibição). Apesar de muitos pesquisadores relatarem que *C.*

*albicans* é um fungo muito resistente, este trabalho demonstrou que o extrato etanólico das folhas de *C. roseus* é eficaz contra este fungo patogênico. Govindasamy e Srinivasan (2012) observaram que o extrato etanólico de *C. roseus* coletadas da região costeira Thondi mostraram ser uma fonte potencial de atividade antimicrobiana contra *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

Apesar dos vários trabalhos listados acima, não foram encontrados na literatura científica estudos demonstrando a capacidade inibitória de extratos das folhas de *C. roseus* com flores rosas frente às espécies de leveduras do gênero *Candida*, justificando desta forma a realização deste estudo.

### **A espécie *Impatiens walleriana***

É também conhecida popularmente como beijo-de-frade, não-me-toques ou bálsamo-de-jardim. É uma herbácea ereta, de consistência suculenta, de 30 a 50 cm de altura; caule nodoso, avermelhado; folhas lanceoladas; flores roxas, vermelhas ou brancas (LOPES et al., 2009). Pertence à família *Balsaminaceae* com finalidade ornamental, invasora originária da África, florescendo o ano todo (CAMPOS et al., 2007).

Segundo Lopes et al. (2009), dois compostos isolados de *Impatiens balsamina* denominados de impatienolato e balsaminolato apresentaram atividade inibitória significativa e seletiva para a enzima cicloxigenase-2. Também foi observado que extratos etanólicos a 35% das pétalas desta planta, bem como seus principais constituintes, foram ativos em modelos animais de dermatites atópicas, pois quando administrados via intravenosa em camundongos com dermatite, inibiram o comportamento de coçar nesses animais.

Além das propriedades biológicas descritas acima, extratos de diferentes espécies de *Impatiens* mostraram possuir também efeitos antimicrobianos. As sementes de *Impatiens balsamina* contêm peptídeos com propriedades antifúngicas e em estudo realizado por De Lucca et al. (1998-1999) revelaram que esses compostos são letais para esporos de *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliforme*. Segundo Domingues et al. (2009), pode-se observar que a extratos hexânicos de *Impatiens walleriana* apresentaram atividade antimicrobiana frente ao fungo *Colletotrichum acutatum*. No entanto, nenhum estudo foi encontrado descrevendo a atividade inibitória de extratos de *Impatiens* sp. frente as leveduras patogênicas do gênero *Candida*.

### **As leveduras *Candida albicans* e *Candida tropicalis***

A *C. albicans* é um habitante normal do trato gastrointestinal e regiões mucocutâneas, incluindo boca e vagina. A *Candida* é um microrganismo saprófito, que, na dependência de fatores predisponentes, que alteram a integridade orgânica, modificam a sua conformação leveduriforme para uma forma fusiforme e torna-se patogênico (ALVES et al., 2006).

A *C. tropicalis* é um agente freqüente de candidemia em hospitais brasileiros, sendo a segunda espécie mais comumente isolada. A infecção por esse agente pode ocorrer em pacientes de todas as idades, mas acomete pacientes adultos e idosos com maior frequência (MENEZES et al., 2009).

Infecções por *Candida* têm sido observadas desde os tempos de Hipócrates 460 a.C., que descreveu a doença em pacientes debilitados (SERRACARBASSA e DOTTO, 2003). A candidíase caracteriza-se como uma infecção fúngica comum, sendo *C. albicans* seu agente etiológico mais freqüente. Os quadros clínicos mais rotineiramente reportados relacionados à candidíase são a do tipo cutâneo-mucosa, sistêmica/visceral e alérgica. Além das infecções micóticas superficiais em mucosas da cavidade bucal, as espécies de *Candida* podem estar envolvidas com lesões de cárie dentária, infecções periodontais e endodônticas, evidenciando a necessidade de controle de crescimento desses microrganismos (CASTRO e LIMA, 2010).

Em relação ao tratamento da candidíase, vários agentes antifúngicos de uso tópico e sistêmico são utilizados de acordo com o quadro clínico e estado geral do paciente. Uso não racional de medicamentos tem causado uma série de problemas para o ambiente e para os seres humanos, entre os quais destaca-se o aparecimento de resistência (ARRUDA et al., 2006) de algumas cepas aos antifúngicos convencionais, principalmente em indivíduos imunodeprimidos. O estudo de plantas com propriedades terapêuticas, abrangendo aquelas com atividade antimicrobiana tem crescido bastante, não apenas por constituir-se em recurso terapêutico alternativo, mas ainda devido às perspectivas de isolar substâncias que apresentem eficácia significativa e menor índice de desvantagens (ALVES et al., 2006). Diante dessa premissa, investigações vêm sendo realizadas na perspectiva de se conhecer as propriedades biológicas e terapêuticas de extratos de plantas medicinais frente às espécies de *Candida* (CASTRO e LIMA, 2010).

### 3 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi avaliar *in vitro* a atividade antifúngica de extratos etanólicos de *Catharanthus roseus* e *Impatiens walleriana* sobre leveduras patogênicas.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar diferentes diluições a partir dos extratos brutos das folhas coletadas de *Catharanthus roseus* e *Impatiens walleriana*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos através do teste de difusão em ágar frente a duas espécies fúngicas: *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.

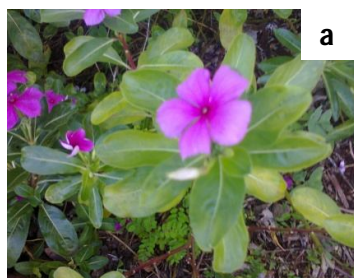
### 4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1 Descrição do local de estágio

As atividades relacionadas ao estágio supervisionado obrigatório ocorreram nas dependências da Universidade Federal do Paraná Setor Palotina e foi caracterizado como estágio obrigatório interno. O período das atividades relativas ao estágio foi de quatro meses (de abril a julho de 2013) totalizando 414 horas de estágio obrigatório. As atividades foram desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia do Bloco Multidisciplinar de Laboratórios da UFPR durante o período matutino.

#### 4.2 Coleta e secagem do material vegetal

As espécies utilizadas nos experimentos, *Catharanthus roseus* L. G. Don (Figura 1-a) e *Impatiens walleriana* Hook f. (Figura 1-b), foram coletadas em jardins no município de Palotina-Pr, sendo que a primeira apresentava flores rosas e a segunda apresentava flores brancas. O material vegetal constituiu-se apenas das folhas que, após a coleta, foram lavadas em água corrente para retirada de impurezas e secas em estufa a 40° C com circulação de ar forçada durante 48 horas.





**Figura 1.** Espécies vegetais utilizadas nos experimentos (a) *Catharanthus roseus* e (b) *Impatiens walleriana*.

#### **4.3 Preparo dos extratos alcoólicos de *Impatiens walleriana* e de *Catharanthus roseus***

Após a secagem, as folhas foram trituradas até a obtenção de um pó fino e submetidas à extração com álcool 70% na proporção de 5 g de folhas para cada 50 mL de álcool. Durante a extração, o material foi mantido na geladeira por 24 horas a 4°C. Após este período, o pó foi separado do solvente através de filtração com o auxílio de gaze e o álcool foi totalmente eliminado utilizando-se um evaporador rotatório com temperatura de 40° C. A partir do extrato bruto obtido, foram preparadas as diluições de 1%, 5%, 10% com água destilada e cada concentração foi dividida em dois frascos, sendo que um frasco foi autoclavado (durante 20 minutos a 120° C e 1 atm de pressão) e o outro não foi autoclavado.

#### **4.4 Preparo do inóculo (suspensão microbiana) para o teste de difusão em ágar**

A atividade antimicrobiana dos extratos vegetais foi determinada frente às leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*. As leveduras foram isoladas e identificadas com o auxílio de testes bioquímicos no Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário do Oeste do Paraná (HUOP), de Cascavel, a partir de amostras clínicas e gentilmente fornecidas ao Laboratório de Microbiologia da UFPR Setor Palotina.

Para cada uma das duas espécies de leveduras utilizadas, uma suspensão microbiana foi obtida a partir de colônias crescidas por 24 horas em meio batata dextrose ágar (BDA) e quatro a cinco colônias fisiologicamente ativas foram diluídas (para evitar selecionar uma cepa variante atípica) em solução salina (NaCl 0,9%) até uma turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala Mac Farland, levando a uma concentração final de leveduras de 10<sup>6</sup> UFC/ml.

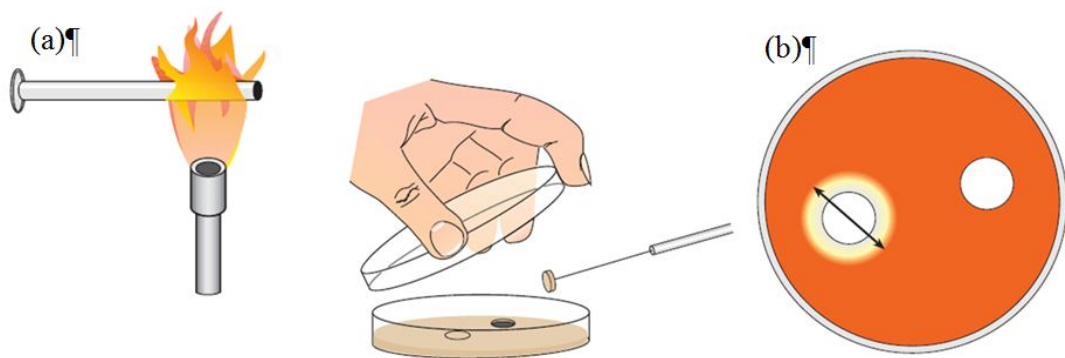
#### **4.5 Teste de difusão em ágar**

O teste de difusão em ágar, também chamado de difusão em placas, é um método físico no qual um microrganismo é desafiado contra uma substância natural ou sintética em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo com a concentração da substância ensaiada (PINTO et al., 2003). A zona ou halo de inibição de crescimento foi medida partindo-se da circunferência do poço, até a margem onde houve crescimento do microrganismo (BARRY e THORNSBERRY, 1991).

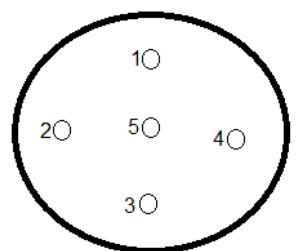
As suspensões fúngicas foram semeadas, com auxílio de um *swab* estéril, sobre a superfície das placas de Petri contendo cerca de 20 mL do meio BDA, com uma espessura de aproximadamente 4 mm.

Para a realização dos testes, em cada placa foram cortados cinco poços de 9 mm de diâmetro com o auxílio de um furador estéril (Figura 2 – a). Com o auxílio de uma micropipeta automática adicionou-se então 40 µL dos extratos: bruto, 1, 5 e 10% e como controle negativo foi utilizado água destilada autoclavada (Figura 3). As placas foram incubadas por até 24 horas a 37°C. Após a incubação, o diâmetro dos halos de inibição foi medido (em mm) (Figura 2 – b) para verificar se houve ou não atividade antimicrobiana.

Cada experimento foi realizado em triplicata de forma independente e os resultados apresentados são uma média dos valores obtidos.



**Figura 2.** (a) Auxílio de um furador estéril para retirar bloco de ágar formando poços no meio batata dextrose ágar. (b) Após a incubação, o halo de inibição do crescimento microbiano ao redor do poço contendo a substância em análise é determinado em mm com auxílio de uma régua.

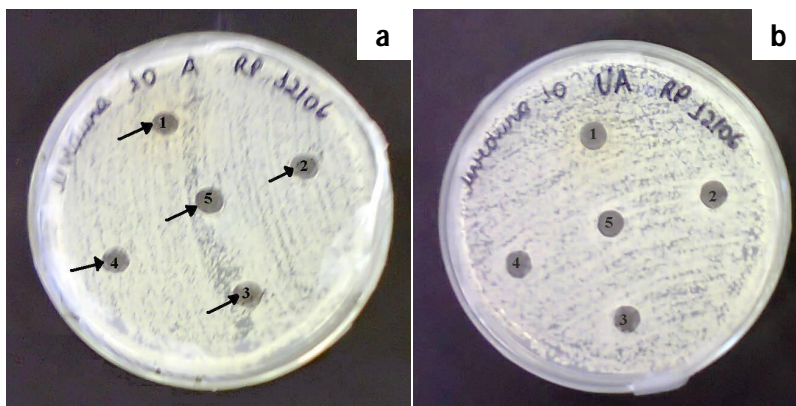


1- Bruto, 2- 10%, 3- 5%, 4- 1%, 5- H<sub>2</sub>O

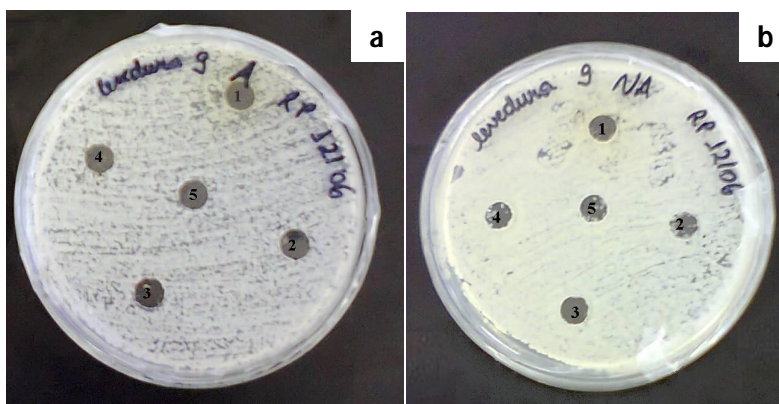
**Figura 3.** Para cada uma das duas espécies de leveduras testadas (*Candida albicans* e *Candida tropicalis*) foram testados os extratos obtidos de *Catharanthus roseus* e *Impatiens walleriana* autoclavados e não autoclavados: extrato bruto (1), diluído a 10% (2); 5% (3); 1% (4) e como controle foi utilizado água destilada (5).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostraram que nenhuma das concentrações dos extratos alcoólicos de *C. roseus*, (autoclavado e não autoclavado), apresentou atividade antimicrobiana, não inibindo o crescimento das duas espécies de leveduras avaliadas (Figuras 4 a-b).



**Figura 4.** Teste de difusão em ágar de extratos alcoólicos obtidos de folhas de *Catharanthus roseus* (a) autoclavado e (b) não autoclavado frente à levedura *Candida albicans* onde (1) corresponde ao extrato bruto; (2) extrato 10%; (3) extrato 5%; (4) extrato 1% e (5) água destilada (testemunha).



**Figura 5.** Teste de difusão em ágar de extratos alcoólicos obtidos de folhas de *Catharanthus roseus* (a) extrato autoclavado e (b) extrato não autoclavado frente à levedura *Candida tropicalis* onde (1) corresponde ao extrato bruto; (2) extrato 10%; (3) extrato 5%; (4) extrato 1% e (5) água destilada (testemunha).

De acordo com os resultados obtidos, podemos observar que as substâncias presentes no extrato alcoólico de *Catharanthus roseus*, nas concentrações testadas, não apresentaram

propriedades inibitórias do crescimento das duas leveduras do gênero *Candida* testadas. Esses resultados diferem daqueles obtidos por Khalil (2012), que demonstrou a atividade antifúngica frente a *Candida albicans* pelo extrato etanólico, na concentração de 100 mg/mL, das folhas de *C. roseus* com flores rosas coletadas na Arábia Saudita. E pode ser justificado com base em trabalho realizado por Skoula et al., (1999) que relatou que o cultivo das mesmas plantas a partir de diferentes localizações geográficas afetam os óleos essenciais da planta e estes, portanto, afetam a atividade antimicrobiana dos seus extratos, isto poderia ser devido as variações ambientais, bem como genética das plantas.

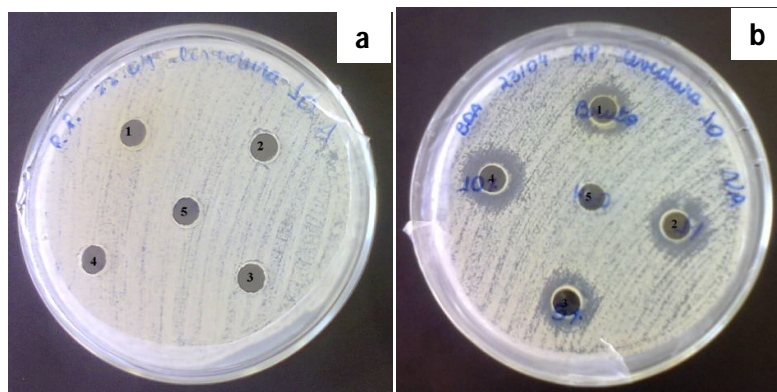
A atividade antimicrobiana desta espécie apresentando flores rosas sobre *C. albicans* e *C. tropicalis* ainda não havia sido descrita anteriormente por outros autores no Brasil.

Nos experimentos realizados foi possível observar que os extratos autoclavados de *Impatiens walleriana* não inibiram o crescimento das duas leveduras testadas (Figura 6 – a), no entanto, houve efeito dos extratos alcoólicos (**Tabela 1**).

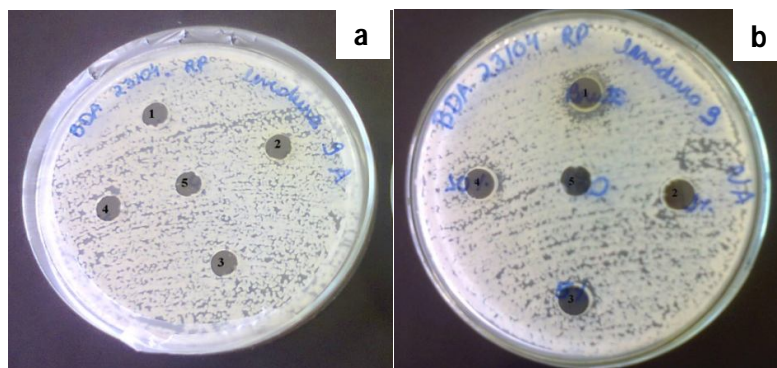
**Tabela 1.** Efeito dos extratos alcoólicos de *Impatiens walleriana* (não autoclavados) sobre o crescimento de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* pelo teste de difusão em ágar após um período de incubação de 24 horas.

Leveduras	Extratos/Diâmetro do halo de inibição (mm)				
	Água destilada	1%	5%	10%	Bruto
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-	2 mm
<i>C. albicans</i>	-	4 mm	4 mm	5 mm	3 mm

Somente o extrato não autoclavado de *I. walleriana* apresentou atividade inibitória (Figura 6 – b). Para a *Candida tropicalis*, observou-se que a diluição do extrato também diluiu a(s) substância(s) ativa(s), o suficiente para não ter efeito, e assim a inibição do crescimento fúngico somente foi verificado na presença do extrato bruto (Figura 7 – b). Já, para a *Candida albicans*, a diluição das concentrações do extrato não autoclavado não influenciou para a diminuição do diâmetro dos halos de inibição das leveduras.



**Figura 6.** Teste de difusão em ágar de extratos alcoólicos obtidos de folhas de *Impatiens walleriana* (a) autoclavado e (b) não autoclavado frente à levedura *Candida albicans* onde (1) corresponde ao extrato bruto; (2) extrato 10%; (3) extrato 5%; (4) extrato 1% e (5) água destilada (testemunha).



**Figura 7.** Teste de difusão em ágar de extratos alcoólicos obtidos de folhas de *Impatiens walleriana* (a) autoclavado e (b) não autoclavado frente à levedura *Candida tropicalis* onde (1) corresponde ao extrato bruto; (2) extrato 10%; (3) extrato 5%; (4) extrato 1% e (5) água destilada (testemunha).

Os resultados encontrados neste trabalho com extratos alcoólicos de *Impatiens walleriana* mostram atividade antifúngica sobre as leveduras *Candida albicans* e *Candida tropicalis* o que ainda não havia sido descrita anteriormente por outros autores.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram o potencial antimicrobiano do extrato alcoólico bruto não autoclavado obtido a partir das folhas de *Impatiens walleriana* ao inibir o crescimento das duas leveduras avaliadas: *Candida albicans* e *C. tropicalis*. As

concentrações diluídas do extrato não autoclavado (1%, 5% e 10%) foram capazes de inibir o crescimento apenas da *Candida albicans*. Observou-se também que o extrato autoclavado de *I. walleriana*, não apresentou potencial antimicrobiano, frente às duas leveduras alvo. Já para o extrato etanólico de *C. roseus*, observou-se que tanto o extrato autoclavado quanto o não autoclavado não apresentou halo de inibição, nem na sua forma bruta, nem nas concentrações diluídas, frente às duas leveduras. Seria necessário um estudo mais aprofundado em relação aos testes com *Impatiens walleriana* sobre a *Candida albicans* e *Candida tropicalis* a fim de verificar quais são os compostos responsáveis pela atividade.

Assim, demonstramos que a *I. walleriana* é uma fonte potencial de agentes antimicrobianos, o que motiva posteriores estudos sobre sua atividade frente a outros microrganismos (fungos ou bactérias) e testes de citotoxicidade para posterior desenvolvimento de produtos que possam ser usados na indústria farmacêutica.

## 7 REFERÊNCIAS

- ALVES, P. M.; LEITE, P. H. A. S.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, L. F.; PEREIRA, M. S. V.; HIGINO, J. S.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: Uma avaliação *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 192-196, 2006.
- ARAÚJO, J. C. L. V.; LIMA, E. O.; CEBALLOS, B. S. O.; FREIRE, K. R. L.; SOUZA, E. L.; FILHO, L. S. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 33, n. 1, p. 55-64, 2004.
- ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M.P.; CATÃO, R. M.R.; LIMA, E. O.; SOUSA, D. P.; NUNES, X. P.; PEREIRA, M. S.V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CUNHA, E. V. L. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 307-311, 2006.
- BARRY, A. L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: Diffusion test procedures. In: balows a, hauser wj, hermann kl, isenberg hd, shamody hj 1991. **Manual of clinical microbiology**, v. 5, p. 1117-1125, 1991.

CAMPOS, N. R.; SIQUEIRA, P.; VOLTOLINI, J. C. Abundância da planta invasora maria-sem-vergonha (*Impatiens walleriana*) em trilhas com diferentes níveis de uso turístico, caxambu, mg. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, 2007.

CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; LIMA, LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Riparinas sobre Cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* Multirresistentes. **RBAC**, v. 37, n. 4, p. 247-249, 2005.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp. **Rev Odontol UNESP**, v. 39, n. 3, p. 179-184, 2010.

COOK, N. B. *Micologia Fundamentos e Diagnóstico*. Rio de Janeiro: **Ed. Revinter Ltda**, 2001.

DE LUCCA, A. J., JACKS, T. J. & BROEKAERT, W. J.. Fungicidal and binding properties of three plant peptides. **Mycopathologia**, v. 144, n.2, p. 87-91, 1998- 1999.

DEMATTÊ, M. E. S. P.; HAAG, H.P.; VASQUES, L. H. Nutrição mineral de plantas ornamentais. xi deficiências de macronutrientes e de boro em *Catharanthus roseus* (L.) G. Don e *Catharanthus roseus* f. *albus* (sweet) G. Don. **Anais da E. S. A. “Luiz de Queiroz”**, v. XLIV, p. 419-432, 1987.

DOMINGUES, R.J.; DE SOUZA, J.D.F.; TÖFOLI, J.G. ; MATHEUS, D.R. Ação “in vitro” de extratos vegetais sobre *Colletotrichum acutatum*, *Alternaria solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 643-649, 2009.

GOVINDASAMY, C.; SRINIVASAN, R. In vitro antibacterial activity and phytochemical analysis of *Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 155-158, 2012.

HANSEN, I., NISSEN, N. I. Vinca alkaloids, a newer group of anti-neoplastic drugs. **Ugeskr Laeger**, v. 134, n. 25, p. 1315-1321, 1972.

JAIN, B. Antimicrobial activity of seed extract of *Impatiens balsamina* Linn. **Current World Environment**, v. 6, n. 2, p. 299-300, 2011.

KHALIL, A. Antimicrobial Activity of Ethanol Leaf Extracts of *Catharanthus Roseus* From Saudi Arabia. **IPCBEE** v. 48, p. 6-11, 2012.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 2, p. 197-201, 2006.

LOPES, R. K.; RITTER, M. R.; RATES, S. M. K. Revisão das atividades biológicas e toxicidade das plantas ornamentais mais utilizadas no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 3, p. 305-315, 2009.

LOURENZONI JUNIOR, A.M.; DOMINGUES, R. J.; TÖFOLI, J.G. Instituto Biológico, Avaliação de extratos vegetais na inibição do crescimento micelial de três fungos fitopatogênicos. **Biológico**, v. 68, n. 1/2, p. 29-86, 2006.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MENEZES, E. A.; MENDES, L. G.; CUNHA, F. A. Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 42, n. 3, p. 354-355, 2009.

NISAR, M.; QAYUM, M.; SHAH, M. R.; SIDDIQUI, H. L.; KALEEM, W. A.; ZIA-UL-HAQ, M. Biological screening os impatiens bicolor royle. **Pak. J. Bot.**, v. 42, n. 3, p. 1903-1907, 2010.

NOBLE C. O., GUO Z., HAYES M. E., MARKS J. D., PARK J. W., BENZ C. C., KIRPOTIN D. B., DRUMMOND D. C. Characterization of highly stable liposomal and immunoliposomal formulations of vincristine and vinblastine. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 64, n. 4, p 741-751, 2009.



OLIVEIRA, M. H.; INNOCENTE, A. M.; PEREIRA, A. G.; DIAS, D. O.; OLIVEIRA, E. G.; BARRETO, F.; FREITAS, F. A.; MEIRELLES, G. C.; SILVA, G. N. S.; MACHADO, J. C.; BIDONE, J.; ANDRADE, J. M. M.; SCHWINGEL, L.; MÜLLER, L. G.; PINTO, P. S.; BERNARDI, R. M.; KAISER, S.; SOUZA, T. T.; GNOATTO S. C. B. Semi-síntese: uma solução para problemas farmacológicos de produtos naturais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. IX, n. 1, p. 62 - 88, 2012.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OKU, H. & ISHIGURO, K. Screening method for PAF antagonist substances: on the phenolic compounds from *Impatiens balsamina* L. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 6, p. 521-5, 1999.

PACKER, J. F.; DA LUZ, M. M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 102-107, 2007.

PATIL, P. J.; GHOSH, J. S. Antimicrobial Activity of *Catharanthus roseus* – A Detailed Study. **British Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 1, n. 1, p. 40-44, 2010.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, **Correlatos e Cosméticos**, v. 2, p. 325, 2003.

SANTOS, M. C. A.; FREITAS, S. DE P.; AROUCHA, E. M. M.; SANTOS, A. L. A. Anatomia e histoquímica de folhas e raízes de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 9, n. 1, p. 24-30, 2009.

SERRACARBASSA, P. D.; DOTTO, P. Endoftalmite por *Candida albicans*. **Arq. Bras. Oftalmol.** v. 66, p. 701-707, 2003.

STEFANELLO, M. É. A.; SALVADOR, M. J.; ITO, I. Y.; MACARI, P. A. T. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* ssp *floccosa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 525-530, 2006.

ST-PIERRE, B.; VAZQUEZ-FLOTA, F. A.; DE LUCA, V. Multicellular Compartmentation of *Catharanthus roseus* Alkaloid Biosynthesis Predicts Intercellular Translocation of a Pathway Intermediate. **The Plant Cell**, v. 11, p. 887–900, 1999.

SKOULA, M.; EL HILALI, I.; Markies, A.M. Evaluation of the genetic diversity of *Salvia fruticosa* Mill. Clones using RAPD markers and comparison with the essential oil profile. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 27, p. 559-568, 1999.

YAMAMOTO, H.; OGAWA, T. Antimicrobial activity of perilla seed polyphenols against oral pathogenic bacteria. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 66, n. 4, p. 921-924, 2002.